

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

#2  
20 Oct 01  
R. Tallant

**Aktenzeichen:** 100 38 528.1

**Anmeldetag:** 08. August 2000

**Anmelder/Inhaber:** Carl Zeiss Jena GmbH, Jena/DE

**Bezeichnung:** Verfahren zur Erhöhung der spektralen  
und räumlichen Detektorauflösung

**IPC:** G 01 J, G 01 N, G 02 B

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. September 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Nietiedt dt

## **Verfahren zur Erhöhung der spektralen und räumlichen Detektorauflösung**

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Anordnung in der Fluoreszenzmikroskopie, insbesondere der Laser Scanning Mikroskopie, der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie und der Scanning Nahfeld-mikroskopie, zur Untersuchung von vorwiegend biologischen Proben, Präparaten und zugehörigen Komponenten. Mit eingeschlossen sind auf Fluoreszenzdetektion basierenden Verfahren zum Screenen von Wirkstoffen (High Throughput Sceening). Durch den Übergang von der Detektion von wenigen breiten spektralen Farbstoffbändern zur simultanen Aufnahme kompletter Spektren eröffnen sich neue Möglichkeiten bei der Identifikation, Separation und Zuordnung der meist analytischen oder funktionalen Probeneigenschaften zu räumlichen Teilstrukturen oder dynamischen Prozessen. Simultan-Untersuchungen von Proben mit Mehrfachfluorophoren werden damit bei überlappenden Fluoreszenzspektren auch in räumlichen Strukturen von dicken Proben möglich. Durch die Anordnung wird die spektrale und räumliche Auflösung der Detektionseinheit erhöht.

### **Stand der Technik**

Ein klassisches Anwendungsgebiet der Lichtmikroskopie zur Untersuchung von biologischen Präparaten ist die Fluoreszenzmikroskopie (Lit.: Pawley, „Handbook of biological confocal Microscopy“; Plenum Press 1995). Hierbei werden bestimmte Farbstoffe zur spezifischen Markierung von Zellteilen verwendet.

Die eingestrahlten Photonen einer bestimmten Energie regen die Farbstoffmoleküle durch die Absorption eines Photons aus dem Grundzustand in einen angeregten Zustand an. Diese Anregung wird meist als Einphotonen-Absorption bezeichnet (Abb. 1a). Die so angeregten Farbstoffmoleküle können auf verschiedene Weise in den Grundzustand zurück gelangen. In der Fluoreszenzmikroskopie ist der Übergang unter Aussendung eines Fluoreszenzphotons am wichtigsten. Die Wellenlänge des emittierten Photons ist aufgrund der Stokesverschiebung im Vergleich zur

4 5 7

Anregungsstrahlung generell rot verschoben, besitzt also eine größere Wellenlänge. Die Stokesverschiebung ermöglicht die Trennung der Fluoreszenzstrahlung von der Anregungsstrahlung.

Das Fluoreszenzlicht wird mit geeigneten dichroitischen Strahlteilern in Kombination mit Blockfiltern von der Anregungsstrahlung abgespalten und getrennt beobachtet. Dadurch ist die Darstellung einzelner, mit verschiedenen Farbstoffen eingefärbten Zellteilen, möglich. Grundsätzlich können jedoch auch mehrere Teile eines Präparates gleichzeitig mit verschiedenen sich spezifisch anlagernden Farbstoffen eingefärbt werden (Mehrfachfluoreszenz). Zur Unterscheidung, der von den einzelnen Farbstoffen ausgesendeten Fluoreszenzsignale, werden wiederum spezielle dichroitischen Strahlteiler verwendet.

Neben der Anregung der Farbstoffmoleküle mit einem hochenergetischen Photon (Einphotonen-Absorption) ist auch eine Anregung mit mehreren Photonen geringerer Energie möglich (Abb. 1b). Die Summe der Energien der Einzelphotonen entspricht hierbei ungefähr einem Vielfachen des hochenergetischen Photons. Diese Art der Anregung der Farbstoffe wird als Mehrphotonen-Absorption bezeichnet (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996). Die Farbstoffemission wird durch diese Art der Anregung jedoch nicht beeinflusst, d.h. das Emissionsspektrum erfährt bei der Mehrphotonen-Absorption einen negativen Stokesshift, besitzt also eine geringere Wellenlänge im Vergleich zur Anregungsstrahlung. Die Trennung der Anregungs- von der Emissionsstrahlung erfolgt in der gleichen Art und Weise wie bei der Einphotonen-Absorption.

Der Stand der Technik soll im folgenden beispielhaft anhand eines konfokalen Laser-Scanning- Mikroskopes (LSM) erläutert werden (Abb. 2).

Ein LSM gliedert sich im wesentlichen in 4 Module: Lichtquelle, Scanmodul, Detektionseinheit und Mikroskop. Diese Module werden im folgenden näher beschrieben. Es wird zusätzlich auf DE19702753A1 verwiesen.

457

Zur spezifischen Anregung der verschiedenen Farbstoffe in einem Präparat werden in einem LSM Laser mit verschiedenen Wellenlängen eingesetzt. Die Wahl der Anregungswellenlänge richtet sich nach den Absorptionseigenschaften der zu untersuchenden Farbstoffe. Die Anregungsstrahlung wird im Lichtquellenmodul erzeugt. Zum Einsatz kommen hierbei verschiedene Laser (Argon, Argon Krypton, TiSa-Laser). Weiterhin erfolgt im Lichtquellenmodul die Selektion der Wellenlängen und die Einstellung der Intensität der benötigten Anregungswellenlänge, z.B. durch den Einsatz eines akusto optischen Kristalls. Anschließend gelangt die Laserstrahlung über eine Faser oder eine geeignete Spiegelanordnung in das Scanmodul.

Die in der Lichtquelle erzeugte Laserstrahlung wird mit Hilfe des Objektivs (2) beugungsbegrenzt über die Scanner, die Scanoptik und die Tubuslinse in das Präparat fokussiert. Der Fokus rastert punktförmig die Probe in x-y-Richtung ab. Die Pixelverweilzeiten beim Scannen über die Probe liegen meist im Bereich von weniger als einer Mikrosekunde bis zu einigen Sekunden.

Bei einer konfokalen Detektion (descanned Detection) des Fluoreszenzlichtes, gelangt das Licht das aus der Fokusebene (Specimen) und aus den darüber- und darunterliegenden Ebenen emittiert wird, über die Scanner auf einen dichroitischen Strahlteiler (MDB). Dieser trennt das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht. Anschließend wird das Fluoreszenzlicht auf eine Blende (konfokale Blende / Pinhole) fokussiert, die sich genau in einer zur Fokusebene konjugierten Ebene befindet. Dadurch werden Fluoreszenzlichtanteile außerhalb des Fokus unterdrückt. Durch Variieren der Blendengröße kann die optische Auflösung des Mikroskops eingestellt werden. Hinter der Blende befindet sich ein weiterer dichroitischer Blockfilter (EF) der nochmals die Anregungsstrahlung unterdrückt. Nach Passieren des Blockfilters wird das Fluoreszenzlicht mittels eines Punktdetektors (PMT) gemessen.

Bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption erfolgt die Anregung der Farbstofffluoreszenz in einem kleinen Volumen in dem die Anregungsintensität besonders hoch ist. Dieser Bereich ist nur unwesentlich größer als der detektierte Bereich bei Verwendung einer konfokalen Anordnung. Der Einsatz einer konfokalen Blende kann somit entfallen und die Detektion kann direkt nach dem Objektiv erfolgen (non descanned Detektion).

In einer weiteren Anordnung zur Detektion einer durch Mehrphotonenabsorption angeregten Farbstofffluoreszenz erfolgt weiterhin eine descannte Detektion, jedoch wird diesmal die Pupille des Objektivs in die Detektionseinheit abgebildet (nichtkonfokal descannte Detektion).

Von einem dreidimensional ausgeleuchteten Bild wird durch beide Detektionsanordnungen in Verbindung mit der entsprechenden Einphotonen bzw. Mehrphotonen-Absorption nur die Ebene (optischer Schnitt) wiedergegeben, die sich in der Fokusebene des Objektivs befindet. Durch die Aufzeichnung mehrerer optische Schnitte in der x-y Ebene in verschiedenen Tiefen z der Probe kann anschließend rechnergestützt ein dreidimensionales Bild der Probe generiert werden.

Das LSM ist somit zur Untersuchung von dicken Präparaten geeignet. Die Anregungswellenlängen werden durch den verwendeten Farbstoff mit seinen spezifischen Absorptionseigenschaften bestimmt. Auf die Emissionseigenschaften des Farbstoffes abgestimmte dichroitische Filter stellen sicher, daß nur das vom jeweiligen Farbstoff ausgesendete Fluoreszenzlicht vom Punktdetektor gemessen wird.

In biomedizinischen Applikationen werden zur Zeit mehrere verschiedene Zellregionen mit verschiedenen Farbstoffen gleichzeitig markiert (Multifluoreszenz). Die einzelnen Farbstoffe können mit den Stand der Technik entweder aufgrund verschiedener Absorptionseigenschaften oder Emissionseigenschaften (Spektren) getrennt nachgewiesen werden (Abb 3a).

Aufgetragen sind beispielhaft Emissionssignale in Abhängigkeit von der Wellenlänge für verschiedene Farbstoffe (1-4). Zum getrennten Nachweis erfolgt eine zusätzliche Aufspaltung des Fluoreszenzlichts von mehreren Farbstoffen mit den Nebenstrahlteilern (DBS) und eine getrennte Detektion der einzelnen Farbstoffemissionen in verschiedenen Punktdetektoren (PMT x). Eine flexible Anpassung der Detektion und der Anregung an entsprechende neue Farbstoffeigenschaften durch den Anwender ist mit der oben beschriebenen Anordnung nicht möglich. Statt dessen müssen für jeden (neuen) Farbstoff neue dichroitische Strahlteiler und Blockfilter kreiert werden.

57

In einer Anordnung gemäß WO9507447 wird das Fluoreszenzlicht mit Hilfe eines Prismas spektral aufgespalten. Das Verfahren unterscheidet sich von der oben beschriebenen Anordnung mit dichroitischen Filtern nur dadurch, dass der verwendete Filter in seiner Charakteristik einstellbar ist. Es werden jedoch weiterhin pro Punktdetektor vorzugsweise das Emissionsband eines Farbstoffs aufgezeichnet.

Eine schnelle lokale Messung des Emissionsspektrums ist mit beiden Anordnungen nur bedingt möglich, da die Einstellung des Emissionsbereiches auf mechanischen Bewegungen des dichroitischen Filters bzw. von Blenden beruht und somit der maximale spektrale Auflösung auf einige 5nm begrenzt ist. Eine hohe spektrale Auflösung wird z.B. dann benötigt wenn sich die Emissionsspektren wie in Abb. 3b dargestellt überlagern. Abb. 3b zeigt ein solches Verhalten von zwei in der Natur vorkommenden Farbstoffen CFP und GFP. Diese Farbstoffe sind zur Untersuchung von Lebendpräparaten besonders geeignet da sie keine toxischen Wirkungen auf die zu untersuchenden Proben ausüben.

Ist die Lage des Emissionsspektrums der verwendeten Farbstoffe unbekannt oder tritt eine von der Umgebung abhängige Verschiebung des Emissionsspektrums (Abb. 3c) auf, so ist eine hochaufgelöste Detektion der Farbstofffluoreszenzen notwendig. Die Wellenlängenverschiebung kann bis zu mehreren 10 nm betragen. Zur Vermessung des Emissionsspektrums in der Probe werden heutzutage Spektrometer auch in Verbindung mit einem LSM eingesetzt. Hierbei wird statt eines Punktdetektors ein herkömmliches meist hochauflösendes Spektrometer eingesetzt (Patent Dixon, et al. US 5,192,980). Diese können jedoch nur punktuell oder gemittelt über ein Gebiet ein Emissionsspektrum aufzeichnen. Es handelt sich also um eine Art der Spektroskopie. Zusätzlich wird das zumeist schwache Fluoreszenzsignal der Probe auf eine große Anzahl von Einzelkanälen im Spektrometer (meist 512 oder 1024 Einzelkanäle) verteilt bzw. wird ein schmales Fluoreszenzband entsprechend der spektralen Auflösung detektiert. Deshalb ist das Signal pro Einzelkanal äußerst gering und unter Umständen nicht mehr detektierbar.

Statt eines Punktscanners werden nach dem Stand der Technik auch so genannte Linienscanner verwendet (Lit.: Corle, Kino; „Confocal Scanning Optical Microscopy and Related Imaging Systems“; Academic Press 1996). Der prinzipielle Aufbau entspricht im wesentlichen dem eines LSM nach Abb. 2. Jedoch wird statt eines Punktfokus eine Linie in den Fokus abgebildet und die zu untersuchende Probe nur noch in einer Richtung gescannt. Als konfokale Blende dient in einem solchen Aufbau statt einer Lochblende eine Schlitzblende. Eine nichtdescannte Detektion bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption kann auch mit dieser Anordnung erfolgen. Hierzu kann wiederum die konfokale Blende entfallen. Zur Detektion wird meist eine CCD-Zeile mit 1024 oder mehr Bildpunkten eingesetzt. Durch das Scannen einer Linie anstatt eines Punktes kann die Bildaufnahmerate erheblich vergrößert werden. Somit kann dieses Scanverfahren zur Beobachtung von schnell ablaufenden Prozessen in Echtzeit verwendet werden.

Nachteilig bei den Verfahren nach dem Stand der Technik ist, dass der Zeilendetektor üblicherweise sequentiell ausgelesen werden muss, wodurch sich bei schnellen Ausleseraten ein erhöhtes Ausleserauschen ergeben kann.

Aufgabe der Erfindung sind daher neue Methoden zur effizienten und spektral und räumlich hochaufgelösten Detektion von Fluoreszenzfarbstoffen. Diese Methoden sollen in bildgebenden wie in analytischen Mikroskopiern eingesetzt werden können. Die Mikroskopsysteme sind bildgebende Systeme wie Laser-Scanning-Mikroskope zur dreidimensionalen Untersuchung von biologischen Präparaten mit einer optischen, räumlichen Auflösung bis zu 200 nm, Scanning-Nahfeld-Mikroskope zur hochaufgelösten Untersuchung von Oberflächen mit einer Auflösung von bis zu 10 nm. Fluoreszenzkorrelations-Mikroskope zur quantitativen Bestimmung von Molekülkonzentrationen und zur Vermessung von Molekül-Diffusionen. Weiterhin sind auf Fluoreszenzdetektion basierende Verfahren zum Screenen von Farbstoffen eingeschlossen.

In all den o.g. Systemen werden Fluoreszenzfarbstoffe zur spezifischen Markierung der Präparate eingesetzt. Die o.g. Aufgabe wird durch Verfahren und Anordnungen gemäß den unabhängigen Patentansprüchen gelöst.

Bevorzugte Weiterbildungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

### Beschreibung der Erfindung

Beide Verfahren zur Erhöhung der spektralen und der räumlichen Detektorauflösung werden im folgenden einzeln erläutert.

Hintergrund des erfindungsgemäßen Verfahrens ist eine spektral aufgespaltete Detektion der Fluoreszenz. Dazu wird das Emissionslicht im Scanmodul oder im Mikroskop (bei Mehrphotonen-Absorption) mit Hilfe eines Elementes zur Trennung der Anregungsstrahlung von der detektierten Strahlung wie dem Hauptfarbteiler (MDB) oder einem AOTF gemäß 7346DE oder gemäß 7323DE vom Anregungslicht abgespalten. Bei Durchlichtanordnungen kann ein derartiges Element auch völlig entfallen. Ein Blockschaltbild der nun folgenden Detektoreinheit ist in

Abb. 5 dargestellt. Das Licht L der Probe wird mit Hilfe einer abbildenden Optik PO bei konfokaler Detektion durch eine Blende (Pinhole) PH fokussiert, wodurch Fluoreszenz, die außerhalb des Fokus entstand, unterdrückt wird. Bei einer nichtdescannten Detektion entfällt die Blende. Das Licht wird nun mit Hilfe eines winkeldispersiven Elements DI in seine Spektralanteile zerlegt. Als winkeldispersive Elemente kommen Prismen, Gitter und beispielsweise akusto optische Elemente in Frage. Das vom dispersiven Element in seine spektralen Komponenten aufgespaltete Licht wird im Anschluß auf einen Zeilendetektor DE abgebildet. Dieser Zeilendetektor DE mißt also das Emissionssignal S in Abhängigkeit von der Wellenlänge und wandelt dies in elektrische Signale um. Mit Hilfe eines erfindungsgemäßen, im folgenden näher erläuterten Wellenlängenscanners WS kann die Lage des Fluoreszenzspektrum relativ zum Zeilendetektor definiert um eine Wegstrecke dl durch Verschieben des PMT in Fig.6 oder durch Schwenkung eines Gitters oder Spiegels um einen Drehwinkel  $\phi$  (Fig.6 und weitere) verschoben werden. Zusätzlich kann der Detektionseinheit noch ein Linienfilter zur Unterdrückung der Anregungswellenlängen vorgeschaltet werden.

Eine mögliche Ausführungsform des optischen Strahlenganges der in Abb. 5 im Blockschaltbild gezeigten Detektoreinheit ist in Abb. 6 dargestellt. Der



Aufbau beschreibt im wesentlichen einen Cerny Turner Aufbau. Bei einer konfokalen Detektion wird das Licht L der Probe mit der Pinholeoptik PO durch die konfokale Blende PH fokussiert. Bei einer nichtdescannten Detektion im Falle einer Mehrphotonen-Absorption kann diese Blende entfallen. Der erste abbildende Spiegel M2 kollimiert das Fluoreszenzlicht. Anschließend trifft das Licht auf ein Liniengitter G, beispielsweise ein Gitter mit einer Linienzahl von 651 Linien pro mm. Das Gitter beugt das Licht entsprechend seiner Wellenlänge in verschiedene Richtungen. Der zweite abbildende Spiegel M1 fokussiert die einzelnen spektral aufgespaltenen Wellenlängenanteile auf die entsprechenden Kanäle des Zeilendetektors DE. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz eines Zeilen-Sekundärelektronenvervielfachers der Firma Hamamatsu H7260. Der Detektor besitzt 32 Kanäle und eine hohe Empfindlichkeit. Der freie Spektralbereich der oben beschriebenen Ausführungsform beträgt etwa 350 nm. Der freie Spektralbereich wird in dieser Anordnung gleichmäßig auf die 32 Kanäle des Zeilendetektors verteilt, wodurch sich eine optische Auflösung von etwa 10 nm ergibt. Somit ist diese Anordnung nur bedingt zur Spektroskopie geeignet. Jedoch ist ihr Einsatz in einem bildgebenden System vorteilhaft, da das Signal pro Detektionskanal aufgrund des relativ breiten detektierten Spektralbandes noch relativ groß ist. Eine Verschiebung des Fluoreszenzspektrums kann durch eine Verdrehung beispielsweise des Gitters, von M1, von M2, um den Winkel  $\phi$  und/oder durch eine Verschiebung des Zeilenempfängers in Richtung der Wellenlängenaufspaltung um  $d_l$  erfolgen (siehe Abb). Dies entspricht einer vorteilhaften Ausführung des o.g. Wellenlängenscanners WS.

Eine weitere mögliche Ausführungsform kann die Verwendung eines Matrixdetektors (z.B. eine CCD-Matrix) beinhalten. Hierbei wird in einer Koordinate durch das dispersive Element G eine Aufspaltung in der Zeichenebene in verschiedene Wellenlängenanteile vorgenommen. In der Richtung senkrecht zur Zeichenebene auf dem Matrixdetektor wird eine komplette Zeile (oder Spalte) des gescannten Bildes abgebildet. Diese Ausführungsform ist besonders vorteilhaft beim Aufbau eines Linienscanners. Der prinzipielle Aufbau entspricht im wesentlichen dem eines LSM nach Abb.

2. Jedoch wird statt eines Punktfokus eine Linie wie gestrichelt dargestellt, beispielsweise durch eine Zylinderlinse ZL in den Fokus abgebildet und die zu untersuchende Probe nur noch in einer Richtung gescannt. Als konfokale Blende dient in einem solchen Aufbau statt einer Lochblende eine Schlitzblende. Eine nichtdescannte Detektion insbesondere bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption kann auch mit dieser Anordnung wie in Fig.2 dargestellt, erfolgen. Weiterhin kann die Schlitzblende bei Mehrphotonenabsorption entfallen.

Hintergrund des Verfahrens zur Erhöhung der räumlichen Detektorauflösung vorzugsweise bei einem in Echtzeit bildgebenden Verfahren ist eine linienförmige Anregung und Detektion der Probe (Linien-scanner). Das Emissionslicht wird im Scanmodul oder im Mikroskop (bei Mehrphotonen-Absorption) mit Hilfe beispielsweise des Hauptfarbteilers (MDB) vom Anregungslicht abgespalten. Ein Blockschaltbild der nun folgenden Detektoreinheit ist in Abb. 7 dargestellt. Das Licht der Probe wird mit Hilfe einer abbildenden Optik PO bei konfokaler Detektion durch eine Schlitzblende PH 1 fokussiert, wodurch Fluoreszenz, die außerhalb des Fokus entstand, unterdrückt wird. Bei einer nichtdescannten Detektion entfällt die Blende. Das Licht kann nun auch mit Hilfe eines in Fig.8 dargestellten Spiegels SP, der sich in einer zu den Scanspiegeln x/y optisch konjugierten Ebene (Pupille der optischen Beleuchtungsanordnung) befindet, auf den Zeilendetektor DE abgebildet werden.

Hier erfolgt keine dispersive Aufspaltung sondern eine breitbandige Erfassung des Fluoreszenzlichtes mittels der Detektionseinheit, wobei die Ortsauflösung entlang der Scanlinie mittels des Detektors realisiert wird.

Mit Hilfe des Spiegels SP kann die Lage der Fluoreszenzlinie relativ zum Zeilendetektor definiert um  $\Delta l$  verschoben werden (Positionsscanner WS). Dieser Zeilendetektor DE mißt also das Emissionssignal in Abhängigkeit von der Position in der die Anregung in der Probe erfolgte und wandelt dies in elektrische Signale um. Zusätzlich wird vorteilhaft der Detektionseinheit noch ein (nicht dargestellter) Linienfilter zur Unterdrückung der Anregungswellenlängen vorgeschaltet. Weiterhin ist eine Aufspaltung der

Fluoreszenzsignale verschiedener Farbstoffe mit entsprechenden dichroitischen Filtern nach dem Stand der Technik und eine getrennte Detektion der Fluoreszenzsignale mit verschiedenen Detektionseinrichtungen Teil dieser Erfindung.

Eine mögliche Ausführungsform des optischen Strahlenganges der in Abb. 7 im Blockschaltbild gezeigten Detektoreinheit ist in Abb. 8 dargestellt. Bei einer konfokalen Detektion wird das Licht L der Probe mit der Pinholeoptik PO durch die konfokale Schlitzblende PHS fokussiert. Bei einer nichtdescannten Detektion im Falle einer Mehrphotonen-Absorption kann diese Blende entfallen. Der erste abbildende Spiegel M2 kollimiert das Fluoreszenzlicht. Anschließend trifft das Licht auf einen weiteren ebenen Spiegel SP. Der Spiegel SP befindet sich in einer Pupille der optischen Beleuchtungseinrichtung und ist drehbar gelagert. Der zweite abbildende Spiegel M1 fokussiert die Scanlinie auf die entsprechenden Kanäle des Zeilendetektors DE. Besonders vorteilhaft ist der Einsatz eines Zeilen-Sekundärelektronenvervielfachers der Firma Hamamatsu H7260. Der Detektor besitzt 32 Kanäle und eine hohe Empfindlichkeit. Weiterhin ist das Signal pro Detektionskanal aufgrund des relativ breiten detektierten Linienteilstückes noch relativ groß ist. Eine Verschiebung der Scanlinie kann durch eine Verdrehung beispielsweise des Spiegels SP um eine Achse senkrecht zur Scanlinie entlang der y Koordinate am PMT und parallel zur Spiegelebene, von M1, von M2 um  $\phi$  und/oder durch eine Verschiebung des Zeilenempfängers um  $d_l$  erfolgen. Dies entspricht dem o.g. Positionsscanner WS. Eine nichtdescannte Detektion insbesondere bei Verwendung einer Mehrphotonen-Absorption kann auch mit dieser Anordnung wie in Fig.2 dargestellt, erfolgen. Weiterhin kann die Schlitzblende bei Mehrphotonenabsorption entfallen.

Liegt die Scanlinie z.B. entlang der X Achse so kann der Scanner den Positionsscan WS um  $d_l$  übernehmen. In diesem Falle würde der Spiegel SP in Abb.8 fest stehen. Hierbei wird nicht die Scanlinie mittels WS relativ zum Detektor sondern vielmehr die Scanlinie in der Probe entlang der x-Achse bewegt. Beide Bewegungen sind prinzipiell gleich. Der y Scanner bewegt in

diesem Falle die Linie entlang der y Achse über das Präparat. Die Funktionen der x bzw. y Achsen können auch vertauscht werden.

Der Vorteil der letzten Variante liegt darin, dass zwischen einem punktscannenden LSM mit hoher spektraler Auflösung (durch dispersive Aufspaltung gemäß Fig. 5 und 6) und einem linienscannenden mit geringerer spektraler Auflösung aber hoher Scangeschwindigkeit (gemäß Abb. 7 und 8) hin und her geschaltet werden kann, wobei jedesmal auf die gleiche Detektion zurückgegriffen werden kann. Dazu wird beispielsweise vorteilhaft anstatt des Spiegels bzw. des Gitter ein Schaltelement an dem sich beide optischen Elemente befinden angebracht. Wird vom Punktscanner zum Linienscanner umgeschaltet, so wird in den Strahlengang zwischen MDB. und Lasereinkopplung im Scanmodul eine Zylinderlinse ZL in Abb. 2 zur Formung einer Scanlinie eingebracht, das Pinhole zu einer Schlitzblende verändert oder ausgewechselt und der Spiegel SP eingedreht. Abb. 9 zeigt verschiedene Anordnungen zur Ausbildung des Schaltelements G/SP. Abb 9a) zeigt ein drehbares Element auf dem sich auf der Vorderseite ein Spiegel und auf der Rückseite ein Gitter befindet. Abb 9b) zeigt eine drehbare Anordnung mit 2 Gittern und einem Spiegel. Durch die Verwendung von mehreren Gittern kann die potentielle spektrale Auflösung der Detektionseinheit variiert werden. Abb 9c) zeigt eine Anordnung bei der G/SP vertikal (oder horizontal bei um 90° gedrehter Anordnung) verschoben wird und im oberen Teil mit einem Gitter und im unteren Teil mit einem Spiegel belegt wurde. Eine Kombination der in Abb. 9 dargestellten Anordnungen sind uneingeschränkt Teil der Erfindung.

Eine weitere mögliche Ausführungsform kann die Verwendung eines Matrixdetektors (z.B. eine CCD, oder eine 8 x 8 PMT Matrix von Hamamatsu H7546) beinhalten. Diese Ausführungsform ist besonders vorteilhaft beim Aufbau eines spektral hoch auflösenden Echtzeit-Linienscanners. Hierzu wird wiederum statt des Spiegels SP in Abb. 8 ein Gitter verwendet, welches das Fluoreszenzlicht senkrecht zu den Gitterlinien spektral in Zeichenebene aufspaltet und entlang einer Koordinate des Matrixdetektors abbildet. In der hierzu senkrechten Richtung auf dem Matrixdetektor wird eine komplette Zeile (oder Spalte) des gescannten Bildes abgebildet. Die Scanlinie ist hierbei

parallel zu den Gitterlinien ausgerichtet. Die Drehung des Gitters kann um die vertikale Achse, d.h. senkrecht zur Zeichenebene, zur Erhöhung der spektralen Detektorauflösung erfolgen. Eine zusätzliche Drehung um eine horizontale Achse, die in der Gitterebene und senkrecht zu den Gitterlinien liegt, kann der Erhöhung der räumlichen Detektorauflösung dienen, indem mittels der Schwenkung des Gitters die Scanlinie über den Detektor bewegt wird.

Liegt die Scanlinie z.B. entlang der X Achse so kann der x-Scanner den Positionsscan WS um  $d_l$  übernehmen. In diesem Falls würde das Gitter in Abb.8 in seiner horizontalen Verkipfung vorzugsweise fest stehen. Der y Scanner bewegt in diesem Falle die Scanlinie entlang der y Achse über das Präparat. In einer weiteren Ausführungsform kann auch das Gitter in seiner horizontalen und seiner vertikalen Verkipfung fest stehen. Der Positionsscan zur Erhöhung der räumlichen Auflösung erfolgt weiterhin durch den x-Scanner. Eine Erhöhung der spektralen Detektorauflösung wird in diesem Falle nicht durchgeführt. Die Funktionen der x bzw. y Achsen können auch vertauscht werden.

Die spektrale bzw. räumliche Auflösung ist bei den oben dargestellten optischen Anordnungen durch die Größe und Anzahl der Einzelkanäle festgelegt. In den oben beschriebenen Ausführungsformen detektiert jeder Einzelkanal ein Spektralband des Emissionsspektrums mit einer spektralen Breite von ca. 10 nm. Hingegen beträgt die potentielle spektrale Auflösung der Spektrometeranordnung ( $\Delta\lambda$ ) aufgrund des verwendeten Gitters 1.5 nm. Bei Anwendung der oben beschriebenen Anordnungen in einem Linienscanner detektiert jeder Einzelkanal bei einer geforderten Pixelauflösung von beispielsweise 512 Pixeln die Summe von  $512/32=16$  Einzelbildpunkten.

Um die spektrale bzw. räumliche Auflösung der Detektionseinheit um einen Faktor  $n$  zu erhöhen, wird das Fluoreszenzspektrum bzw. die Scanlinie in  $n$  Schritten um jeweils ein Vielfaches von  $L/n$ , wobei  $L$  der Breite eines

Einzelkanals entspricht, verschoben. Abb. 10 zeigt schematisch jeweils in einer Zeile die verschiedenen Einzelkanäle des Zeilendetektors, deren  $N$  Einzelsignale  $C$  entsprechen. Für den oben erwähnten Zeilendetektor H7260 ist  $N = 32$ . In Richtung der  $dl$ -Achse sind verschiedene Stellungen des detektierten Signales (Emissionspektrum bzw. Scanlinie) als Funktion des oben beschriebenen Wellenlängen- bzw. Positronsscanners dargestellt. Eine Verschiebung (entspricht  $WS$ ) des Fluoreszenzspektrums bzw. der Scanlinie kann, wie oben bereits erwähnt, durch eine Drehung des Gitters bzw. des Spiegels um einen Winkel  $\phi$  oder durch Verschiebung  $dl$  des Detektors erfolgen.

Die gemessenen Signale der Einzelkanäle werden mit  $c_{kj}$  (in Abb. 10 als Blöcke dargestellt) bezeichnet, wobei  $k = 1..N$  die Kanalnummer und  $j = 0..n-1$  die Vielfachen der Verschiebung  $L/n$  sind. Fällt das Signal am Rand des Detektors nicht ab, so kann wie in Abbildung 10 grau dargestellt, der letzte Einzelkanal des Detektors so abgedeckt (ausgeblendet) werden, dass nur eine Breite von  $L/n$  zur Messung zur Verfügung steht. Dies ist zur Vermeidung von Artefakten bei der Berechnung notwendig.

Zur Berechnung der  $N$  mal  $n$  Spektralwerte  $S_m$  werden nun Differenzen von Summen über Einzelkanäle nach folgendem Algorithmus gebildet:

$$S_1 = c_{1,0} = \sum_{i=1}^N c_{i,0} - \sum_{i=1}^{N-1} c_{i,1}$$

$$S_2 = c_{1,1} = \sum_{i=1}^N c_{i,1} - \sum_{i=1}^{N-1} c_{i,2}$$

....

$$S_{n-1} = c_{1,n-2} = \sum_{i=1}^N c_{i,n-2} - \sum_{i=1}^{N-1} c_{i,n-1}$$

$$S_n = c_{1,n-1} = \sum_{i=1}^{N-1} c_{i,n-1} - \sum_{i=2}^N c_{i,0} - \sum_{m=1}^{n-2} c_{N,m}$$

....

$$S_{k,n+1} = c_{k,0} = \sum_{i=k}^N c_{i,0} - \sum_{i=k}^{N-1} c_{i,1}$$

$$S_{k,n+2} = c_{k,1} = \sum_{i=k}^N c_{i,1} - \sum_{i=k}^{N-1} c_{i,2}$$

....

$$S_{k,n+j+1} = c_{k,j} = \sum_{i=k}^N c_{i,j} - \sum_{i=k}^{N-1} c_{i,j+1}$$

....

$$S_{(k+1)n-1} = c_{k,n-2} = \sum_{i=k}^N c_{i,n-2} - \sum_{i=k}^{N-1} c_{i,n-1}$$

$$S_{(k+1)n} = c_{k,n-1} = \sum_{i=k}^{N-1} c_{i,n-1} - \sum_{i=k+1}^{N-1} c_{i,0} - \sum_{m=1}^{n-2} c_{N,m}$$

....

$$S_{N,n-n} = c_{N,0} = c_{N,0}$$

$$S_{N,n-n+1} = c_{N,1} = c_{N,1}$$

....

$$S_{N,n} = c_{N,n-1} = c_{N,n-1}$$

Die so berechneten Spektralwerte bzw. Positionswerte  $S$  (Zwischenwerte) können im Anschluß graphisch auf dem angezeigten Bild, z.B. während eines Spektralscans dargestellt werden.

Abb.11a) zeigt die Abhängigkeit der Detektorauflösung von der Anzahl der Verschiebungen  $n$  anhand der oben beschriebenen Spektrometeranordnung. Für  $n=1$  ist die spektrale Auflösung der Detektionseinheit gleich der spektralen Auflösung eines Einzelkanals ( $L$ ), also etwa 10 nm. Für eine 5 malige Wellenlängenverschiebung um  $L/5$  beträgt die spektrale Auflösung der Detektionseinheit 2 nm. Die maximal erreichbare spektrale Auflösung wird durch die Anzahl der Linien des eingesetzten Gitters bestimmt. Diese maximale spektrale Auflösung ( $\Delta\lambda$ ) wird entsprechend dem Abtasttheorem nach Nyquist genau dann erreicht, wenn die Detektorauflösung gleich der halben potentiellen Auflösung der Spektrometeranordnung ( $\Delta\lambda$ ) ist. Dies entspricht einer Anzahl:

$$n_{\max} = 2 \cdot \frac{L}{\Delta\lambda}$$

und beträgt in diesem Falle  $n_{\max}=13$ . Ist die Anzahl der Verschiebungen größer als  $n_{\max}$  so werden die Spektralkomponenten zu häufig abgetastet und es ergibt sich kein weiterer Auflösungsgewinn. Ist  $n$  kleiner als  $n_{\max}$  so werden zu wenige Spektralkomponenten abgetastet und die Auflösung der Detektionseinheit wird durch den Detektor festgelegt.

Abb. 11b.) zeigt die Abhängigkeit der räumlichen Detektorauflösung von der Anzahl der Verschiebungen. Man erkennt, dass bei einer 16 maligen Positionsverschiebung in einem Linienscanner und einem 32 kanaligen Detektor die gleiche Auflösung erzielt wird, wie bei Verwendung eines Zeilendetektors mit 512 Bildpunkten. Dabei wurde die Bildaufnahmezeit gegenüber dem Punktscanner bei gleicher Bildgröße und einer konstanten Integrationszeit pro Bildpunkt um einen Faktor 32 erhöht.

Eine Anordnung zum Auslesen der Einzelkanäle  $c_{kj}$  in Abhängigkeit vom Drehwinkel  $\phi$  des Gitters bzw. des Spiegels ist in Abb. 12 schematisch dargestellt. Hierbei wird der an den Anoden des PMT fließende Strom, jeweils durch den ersten Amplifier A (als Strom-Spannungswandler geschaltet) in eine Spannung gewandelt und verstärkt. Die Spannung wird einem Integrator I zugeführt der über eine entsprechende Zeit (z.B. Pixelverweilzeit) das Signal integriert.

Zur schnelleren Auswertung kann dem Integrator I ein Komparator K nachgeschaltet werden, der als einfacher Komparator eine Schaltschwelle hat, die bei Überschreitung ein digitales Ausgangssignal erzeugt oder der als Fensterkomparator ausgebildet ist und dann ein digitales Ausgangssignal bildet, wenn sich das Eingangssignal zwischen der oberen und unteren Schaltschwelle befindet oder wenn das Eingangssignal außerhalb (unter oder über) den Schaltschwellen liegt. Die Anordnung des Komparators bzw. des Fensterkomparators kann sowohl vor dem Integrator als auch danach erfolgen. Schaltungsanordnungen ohne Integrator (so genannte Verstärkermode) sind ebenfalls denkbar. Bei der Anordnung im



Verstärkermode wird der Komparator K weiterhin nach entsprechender Pegelanpassung verwendet. Der Ausgang des Komparators K dient als Steuersignal für ein Switch-Register Reg, das direkt die aktiven Kanäle schaltet (online) oder der Zustand wird dem Computer über eine zusätzliche Verbindung V mitgeteilt, um eine individuelle Auswahl der aktiven Kanäle zu treffen (off-line). Das Ausgangssignal des Integrators I wird direkt einem weiteren Ampl. A1 zur Pegelanpassung, für die nachfolgende A/D-Wandlung AD zugeführt. Die AD gewandelten Werte werden über geeignete Datenübertragung an einen Rechner (PC oder Digital-Signal-Prozessor DSP) übertragen.

Eine Änderung des Drehwinkels  $\phi$  bzw. der Verschiebung  $d$  kann bildweise nach der Aufnahme oder während des Scannens eines Bildpunktes bzw. einer Bildzeile / -spalte erfolgen. Die mechanischen Anforderungen an die Scangeschwindigkeit des Wellenlängen- bzw. Positionsscanners (WS) hängen von der Art der Einstellung des Drehwinkels ab. Erfolgt beispielsweise eine bildpunktweise Erhöhung der spektralen oder räumlichen Detektorauflösung so muß der Scan innerhalb der Integrationszeit für diesen Bildpunkt erfolgen (also in einigen Mikrosekunden). Erfolgt die Erhöhung der Detektorauflösung bildweise so muß die Scan innerhalb von einigen Millisekunden bis Sekunden erfolgen. Die Abfolge der Einstellung des Drehwinkels kann beispielsweise bei einer 5 maligen Verschiebung in der Reihenfolge von  $j=0,2,4,3,1$  erfolgen. In diesem Falle wird um  $j \cdot L/5$  (bezogen auf die Ausgangsposition für  $j=0$ ) verschoben. Diese Reihenfolge hat den Vorteil, dass Zwischenwerte schon nach der Aufnahme der Einzelkanäle für  $j=0,2$  und  $4$  berechnet und dargestellt werden können. Im Anschluß werden dann die verbleibenden Einzelkanäle für  $j=1,3$  gemessen und die restlichen Zwischenwerte berechnet und damit die Meßkurve in ihrer Auflösung weiter schrittweise verfeinert.

In einer weiteren Anordnung nach Abb. 12 erfolgt eine Manipulation bzw. Verzerrung der Eingangssignale der Einzeldetektionskanäle durch: eine Veränderung der Verstärkung von (A), eine Veränderung der Integrationszeiten von (I), durch ein Einspeisen eines zusätzlichen Offsets vor

dem Integrator und/oder durch eine digitale Beeinflussung der gezählten Photonen bei einer Photonenanzahlordnung.

In der oben beschriebenen Anordnung wurde eine Integratorschaltung zur Detektion der Einzelkanalsignale verwendet. Uneingeschränkt kann jedoch auch eine Photonenanzählung in den Einzelkanälen erfolgen.

Der o.g. Zeilen- bzw. Matrixdetektor von Hamamatsu besitzt zwischen den aneinander grenzenden Einzelkanälen Stege mit einer Breite von 0.2 mm. Diese Stege wirken sich negativ auf den Berechnungsalgorithmus und auf die Effizienz der Detektionseinrichtung aus. Zur Vermeidung dieses Effektes kann ggf. vor dem Zeilen- bzw. Matrixdetektor ein Mikrolinsenarray nach dem Stand der Technik angeordnet werden. Dieses Linsenarray fokussiert zusätzlich das ankommende Licht auf die aktiven Bereiche (Einzelkanäle) des Zeilen- bzw. Matrixdetektors. Weiterhin wird das Übersprechen zwischen angrenzenden Einzelkanälen minimiert.

In Abb. 13 sind 2 Anwendungen des erfindungsgemäßen Verfahren dargestellt. Abb. 13a1) zeigt die Aufnahme eines Fluoreszenzspektrums mit der Spektrometeranordnung ohne Einsatz des Verfahrens zur Erhöhung der Detektorauflösung und Abb. 13a2) zeigt das Spektrum des gleichen Farbstoffes jedoch diesmal unter Verwendung des Verfahrens. Deutlich ist die Erhöhung der spektralen Auflösung an der Trennung der Laserlinie von der Fluoreszenz sichtbar.

In Abb. 13b1) ist das Bild eines Strichgitters mit dem 32 Kanal-Detektor gemessen worden. Die Struktur des Gitters ist aufgrund der geringen räumlichen Auflösung der Detektor nur schwer erahnbar. Abb. 13b2) zeigt den gleichen Bildausschnitt jedoch diesmal aufgenommen mit dem Verfahren zur Erhöhung der räumlichen Auflösung der Detektionseinheit. Die Strukturen sind gut unterscheidbar.

## Patentansprüche

1.

Verfahren zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen einer beleuchteten Probe ,  
wobei das von der Probe rückgestreute, reflektierte und/ oder fluoreszierte und/ oder transmittierte Signal mit einem ortsauflösenden Detektor detektiert wird, indem die von der Probe kommende Strahlung auf den Detektor abgebildet wird, wobei die Lage der orts aufgelöst gemessenen Strahlung relativ zum Detektor verschoben wird und mittels eines Algorithmus aus den bei verschiedenen Verschiebungen gemessenen Signalen Zwischenwerte zum Zwecke der Erhöhung der Ortsauflösung des Detektors ermittelt werden.

2.

Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Schrittgröße der Verschiebung unterhalb des Rastermaßes der Ortsauflösung des Detektors liegt

3.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Verschiebung des Detektors in Richtung seiner Ortsauflösung und/ oder eine Verschiebung oder Verschwenkung eines abbildenden Elementes in mindestens einer Achse und / oder eines reflektiven Elementes in mindestens einer Achse und/ oder eines dispersiven Elementes in mindestens einer Achse erfolgt.

4.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine spektral aufgelöste Messung von Spektren über ein dem Detektor vorgeordnetes dispersives Element erfolgt

5.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei wobei das disperse Element um mindestens eine Achse schwenkbar ist

6.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei

bei feststehendem dispersiven Element in mindestens einer seiner Schwenkachsen die räumlich verändernde Wirkung der Schwenkung in dieser Achse durch eine Scaneinheit und/oder Verschiebung des Detektors erfolgt.

7.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei bei einem Linienscanner zur Echtzeitmikroskopie eine Verschiebung durch einen um mindestens eine Achse schwenkbaren Spiegel und/ oder eine Verschiebung des Detektors und / oder einen Spiegel einer Scanspiegelanordnung erfolgt.

8.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei wobei bei feststehendem Spiegel in mindestens einer seiner Schwenkachsen die räumlich verändernde Wirkung der Schwenkung in dieser Achse durch eine Scaneinheit und/ oder Verschiebung des Detektors erfolgt.

9.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zwischen einem Linienscan und einer dispersiven Aufspaltung umgeschaltet wird.

10.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein dispersives Element zur Erhöhung der spektralen Auflösung verschwenkt wird und weiterhin eine zusätzliche Bewegung des Detektors und / oder einer Scaneinheit erfolgt.

11.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions - und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der Fluoreszenz und/ oder Lumineszenz und/ oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz.

12.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, zur Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder

zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes  
 bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder  
 zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Emissionsspektrums in  
 Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe  
 gebunden sind und/oder  
 zur Vermessung von Emissionsratiofarbstoffen zur Bestimmung von  
 Ionenkonzentrationen .

13.

Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, zur  
 Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder  
 zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines  
 Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan  
 und/oder

zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Absorptionsspektrums in  
 Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe  
 gebunden sind und/oder

zur Vermessung der Absorptionsratio zur Bestimmung von  
 Ionenkonzentrationen .

14.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
 wobei die Emissionsstrahlung der Probe mit einem dispersiven Element  
 aufgespalten und in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird.

15.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
 wobei die Signale von Detektionskanälen gewandelt und digital ausgelesen  
 werden und die Berechnung des Algorithmus digital in einem Rechner erfolgt.

16.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
 wobei die Signale der Detektorkanäle durch eine nichtlineare Verzerrung der  
 Eingangssignale beeinflußt werden

17.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
 wobei eine Beeinflussung der Integrationsparameter erfolgt

18.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Beeinflussung der Kennlinie eines Verstärkers erfolgt

19.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die berechneten Zwischenwerte und/ oder detektierten Signale zur  
Generierung eines Bildes verwendet wird.

20.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Berechnung der Zwischenwerte zur schrittweisen Verfeinerung  
von Meßkurven erfolgt.

21.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei ein farbkodiertes Fluoreszenzbild erzeugt wird

22.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Überlagerung mit weiteren Bildern erfolgt

23.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei über Komparatoren in Detektionskanälen ein Vergleich des  
gemessenen Signals mit einem Referenzsignal erfolgt und im Falle einer  
Unterschreitung und/oder Überschreitung des Referenzsignals eine  
Veränderung der Betriebsweise des Detektionskanals erfolgt

24.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei eine Abschaltung und/oder Nichtberücksichtigung des jeweiligen  
Detektionskanals erfolgt.

25.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei hierdurch eine Einengung des interessierenden Spektralbereichs  
erfolgt

26.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
wobei die Signale der Detektionskanäle jeweils mittels mindestens einer  
Integratorschaltung generiert werden

27.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle mittels Photonenzählung und anschließender Digital/ Analogwandlung generiert werden

28.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Photonenzählung zeitkorreliert erfolgt

29.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Erfassung von Ein- und/oder Mehrphotonenfluoreszenz und/ oder durch entangled photon angeregter Fluoreszenz

30.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit paralleler Beleuchtung und Detektion, vorzugsweise im Wirkstoffscreening ,wobei die Probe vorzugsweise eine Mikrotiterplatte ist

31

Verfahren nach Anspruch 30, mit linienweiser Detektion

32.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, in einem Mikroskop

33.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion in einem Scanning-Nahfeldmikroskop.

34.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, zur Detektion einer Ein- und/oder Mehrphotonen-Farbstofffluoreszenz in einem Fluoreszenzkorrelierten Spektroskop.

35.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mittels konfokaler Detektion

36.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, mit einer scannenden Anordnung

37.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scanner in der Beleuchtung

38.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scantisch

39.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mittels nichtkonfokaler Detektion

40.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit descannter Detektion

41.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Hellfeldabbildung

42.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Punktabbildung

43.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit nicht descannter Detektion

44.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Hellfeldabbildung

45.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit nicht scannender, konfokaler oder nichtkonfokaler Detektion und Punkt-  
oder Hellfeldabbildung

46.

Verfahren nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scantisch

47. Anordnung zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen einer  
beleuchteten Probe ,



wobei das von der Probe rückgestreute reflektierte und/ oder fluoreszierte und/ oder absorbierte Signal mit einem ortsauflösenden Detektor detektiert wird, indem die von der Probe kommende Strahlung auf den Detektor abgebildet wird, wobei die Lage der ortsaufgelöst gemessenen Strahlung relativ zum Detektor verschoben wird und mittels eines Algorithmus aus den bei verschiedenen Verschiebungen gemessenen Signalen Zwischenwerte zum Zwecke der Erhöhung der Ortsauflösung des Detektors ermittelt werden.

48.

Anordnung nach Anspruch 47, wobei die Schrittgröße der Verschiebung unterhalb des Rastermaßes der Ortsauflösung des Detektors liegt

49

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Verschiebung des Detektors in Richtung seiner Ortsauflösung und/ oder eine Verschiebung oder Verschwenkung eines abbildenden Elementes in mindestens einer Achse und/ oder eines reflektiven Elementes in mindestens einer Achse und/ oder eines dispersiven Elementes in mindestens einer Achse erfolgt.

50.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine spektral aufgelöste Messung von Spektren über ein dem Detektor vorgeordnetes dispersives Element erfolgt

51.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei wobei das disperse Element um mindestens eine Achse schwenkbar ist

52.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei wobei bei feststehendem dispersiven Element in mindestens einer seiner Schwenkachsen die räumlich verändernde Wirkung der Schwenkung in dieser Achse durch eine Scaneinheit erfolgt.

53.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei bei einem

Linien Scanner zur Echtzeitmikroskopie eine Verschiebung durch einen um mindestens eine Achse schwenkbaren Spiegel und/ oder eine Verschiebung des Detektors und / oder einen Spiegel einer Scannspiegelanordnung erfolgt.

54.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei wobei bei feststehendem Spiegel in mindestens einer seiner Schwenkachsen die räumlich verändernde Wirkung der Schwenkung in dieser Achse durch eine Scaneinheit erfolgt.

55.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zwischen einem Linien Scan und einer dispersiven Aufspaltung umgeschaltet wird.

56.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein dispersives Element zur Erhöhung der spektralen Auflösung verschwenkt wird und weiterhin eine zusätzliche Bewegung des Detektors und oder Scanners erfolgt.

57.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei zur optischen Erfassung von charakteristischen Größen des wellenlängenabhängigen Verhaltens einer beleuchteten Probe, insbesondere des Emissions - und/oder Absorptionsverhaltens, vorzugsweise der Fluoreszenz und/ oder Lumineszenz und/ oder Phosphoreszenz und/oder enzymaktivierten Lichtemission und/oder enzymaktivierten Fluoreszenz,

58.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, zur Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Emissionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder

zur Vermessung von Emissionsratiofarbstoffen zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen .

59.

Anordnung nach einem der vorangehenden Ansprüche, zur Unterscheidung von verschiedenen Farbstoffen und/ oder zur Bestimmung der lokalen Farbstoff-Zusammensetzung eines Bildpunktes bei Verwendung von mehreren Farbstoffen simultan und/oder

zur Bestimmung der lokalen Verschiebung des Absorptionsspektrums in Abhängigkeit von der lokalen Umgebung an den der/die Farbstoffe gebunden sind und/oder

zur Vermessung der Absorptionsratio zur Bestimmung von Ionenkonzentrationen .

60.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Emissionsstrahlung der Probe mit einem dispersiven Element aufgespalten und in mindestens einer Richtung orts aufgelöst detektiert wird.

61.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale von Detektionskanälen gewandelt und digital ausgelesen werden und die Berechnung des Algorithmus digital in einem Rechner erfolgt.

62.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektorkanäle durch eine nichtlineare Verzerrung der Eingangssignale beeinflusst werden

63.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Beeinflussung der Integrationsparameter erfolgt

64.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Beeinflussung der Kennlinie eines Verstärkers erfolgt

65.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,

wobei die berechneten Zwischenwerte und/ oder detektierten Signale zur Generierung eines Bildes verwendet wird.

66.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei ein farbkodiertes Fluoreszenzbild erzeugt wird

67.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Überlagerung mit weiteren Bildern erfolgt

68.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei über Komparatoren in Detektionskanälen ein Vergleich des gemessenen Signals mit einem Referenzsignal erfolgt und im Falle einer Unterschreitung und/oder Überschreitung des Referenzsignals eine Veränderung der Betriebsweise des Detektionskanals erfolgt

69.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Abschaltung und/oder Nichtberücksichtigung des jeweiligen Detektionskanals erfolgt.

70.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei hierdurch eine Einengung des interessierenden Spektralbereichs erfolgt

71.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle jeweils mittels mindestens einer Integratorschaltung generiert werden

72.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Signale der Detektionskanäle mittels Photonenzählung und anschließender Digital/ Analogwandlung generiert werden

73.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die Photonenzählung zeitkorreliert erfolgt

74.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
zur Erfassung von Ein- und/oder Mehrphotonenfluoreszenz und/ oder durch  
entangled photon angeregter Fluoreszenz

75.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit paralleler Beleuchtung und Detektion, vorzugsweise im  
Wirkstoffscreening ,wobei die Probe vorzugsweise eine Mikrotiterplatte ist

76.

Anordnung nach Anspruch.75 mit linienweiser Detektion

77.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
in einem Mikroskop

78.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
zur Detektion in einem Scanning-Nahfeldmikroskop.

79.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
zur Detektion einer Ein- und/oder Mehrphotonen-Farbstofffluoreszenz in  
einem Fluoreszenzkorrelierten Spektroskop.

80.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mittels konfokaler Detektion

81.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einer scannenden Anordnung

82.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scanner in der Beleuchtung

83.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scantisch

84.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mittels nichtkonfokaler Detektion

4 5 7  
85.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einer scannenden Anordnung

86.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit descannter Detektion

87.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Hellfeldabbildung

88.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Punktabbildung

89.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit nicht descannter Detektion

90.

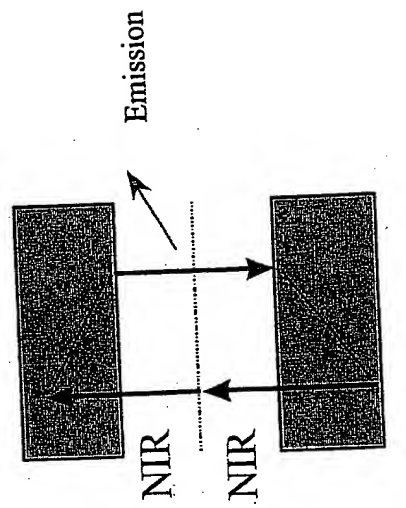
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit Hellfeldabbildung

91.

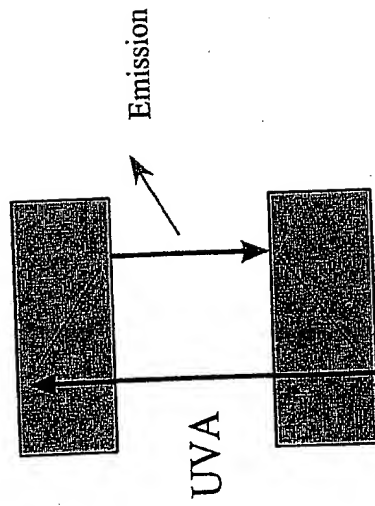
Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit nicht scannender, konfokaler oder nichtkonfokaler Detektion und Punkt-  
oder Hellfeldabbildung

92.

Anordnung nach mindestens einem der vorangehenden Ansprüche,  
mit einem X/Y Scantisch



b.)

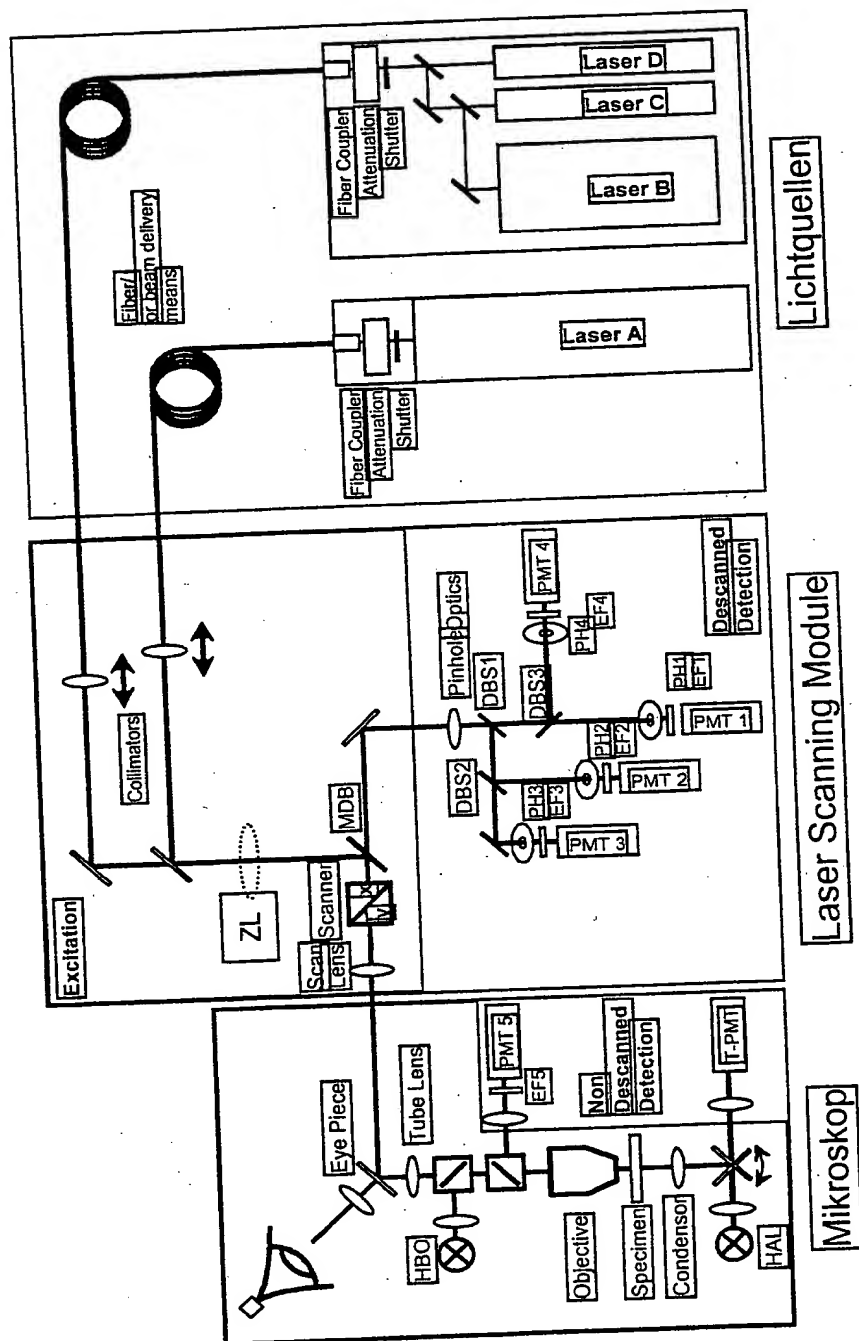


a.)

b) Mehrphotonen-Absorption

a) Einphotonen-Absorption

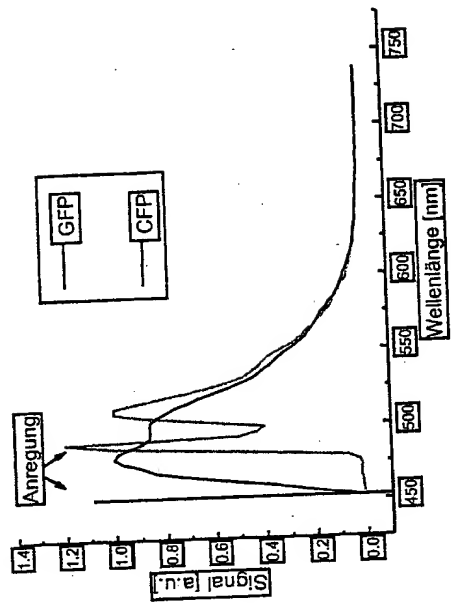
Figure: 1



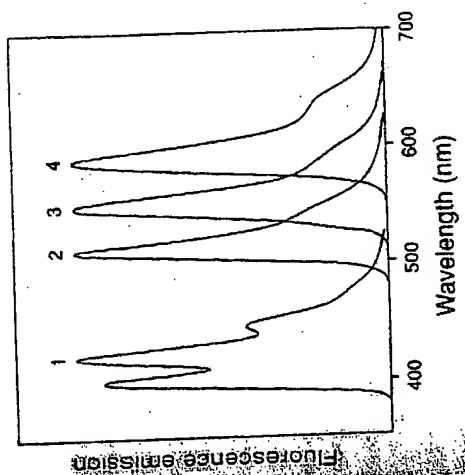
Aufbau LSM (Stand der Technik)

Figure: 2

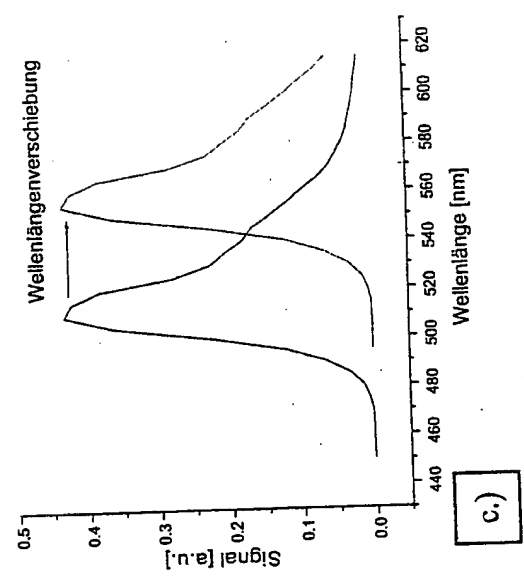




b.)



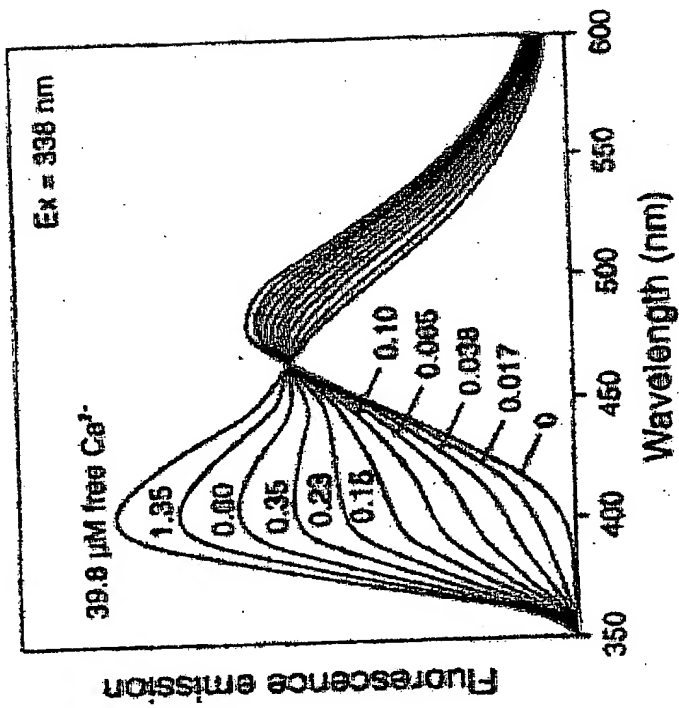
a.)



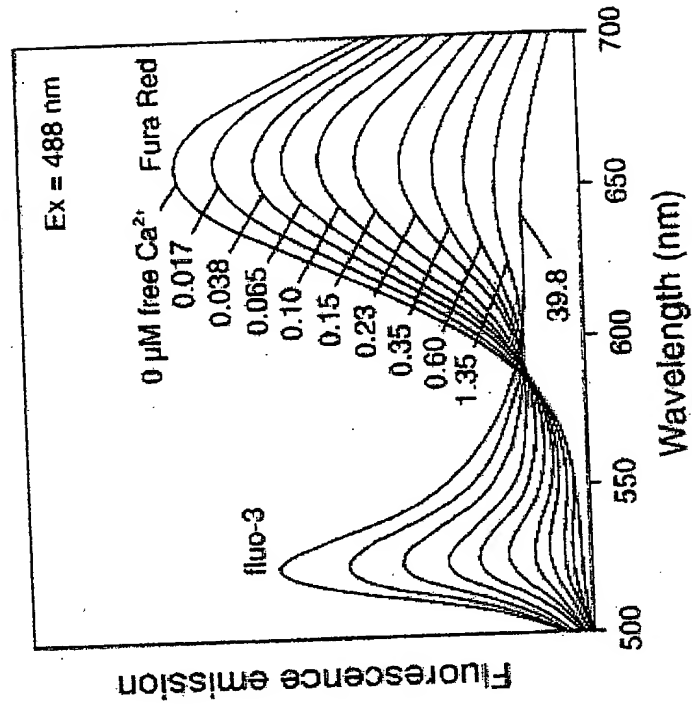
c.)

Typische Spektren a.) Farbstoffe, b) Fluoreszierende Proteine  
c) Wellenlängenverschiebung in Abh. von der Umgebung, d) FRET

Figure: 3



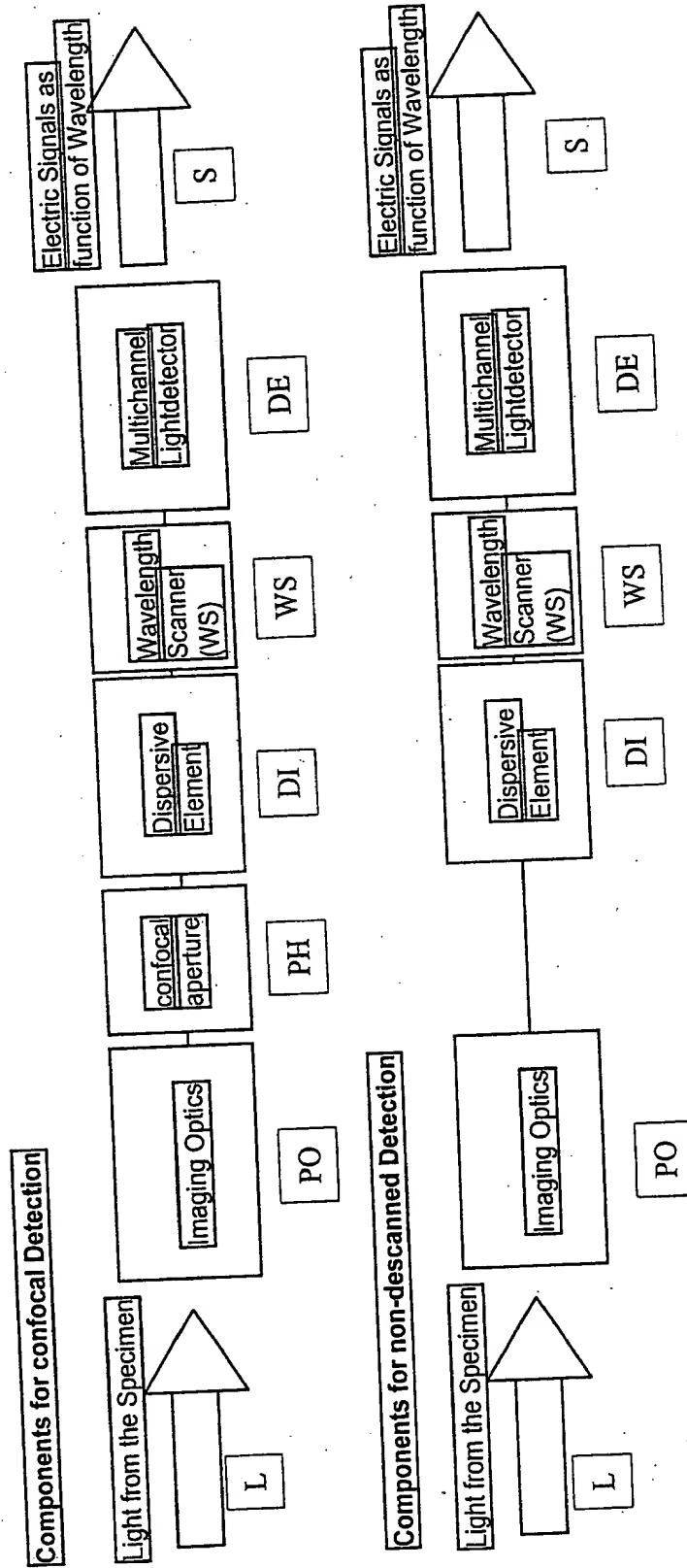
a.)



b.)

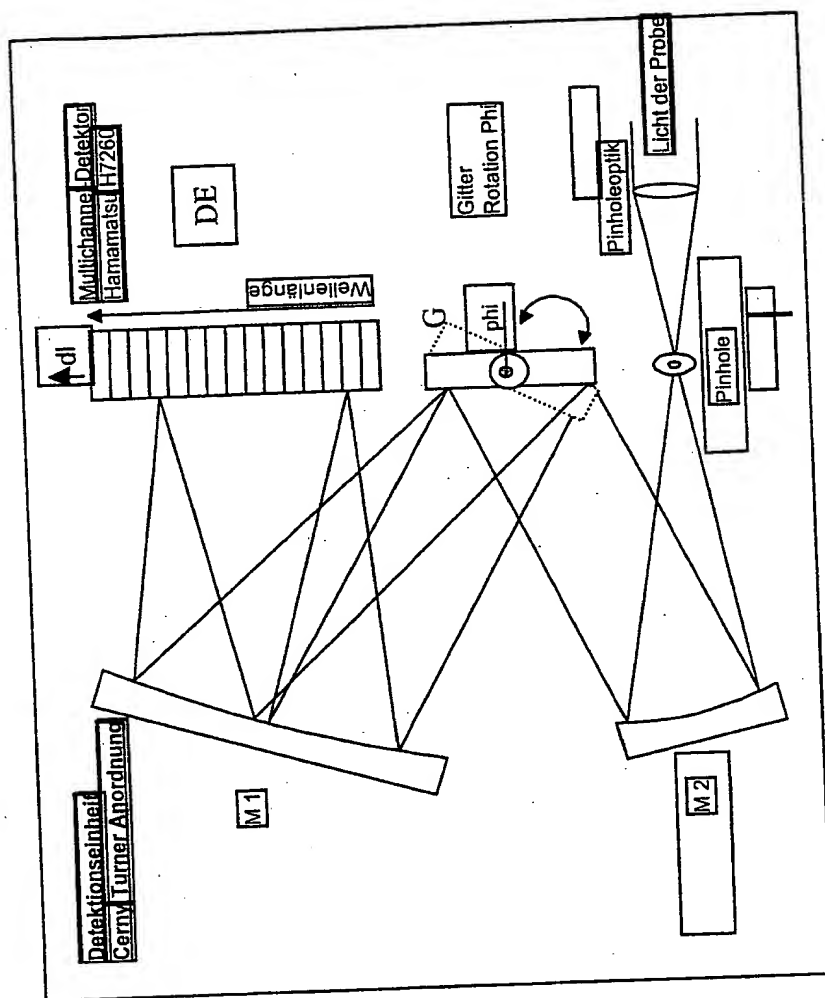
Typische Spektren zu ratiometrischen Messungen  
a.) ein Farbstoff mit Emissionsratio, b) 2 Farbstoffe mit Ionenabh. Signalen

Figure: 4



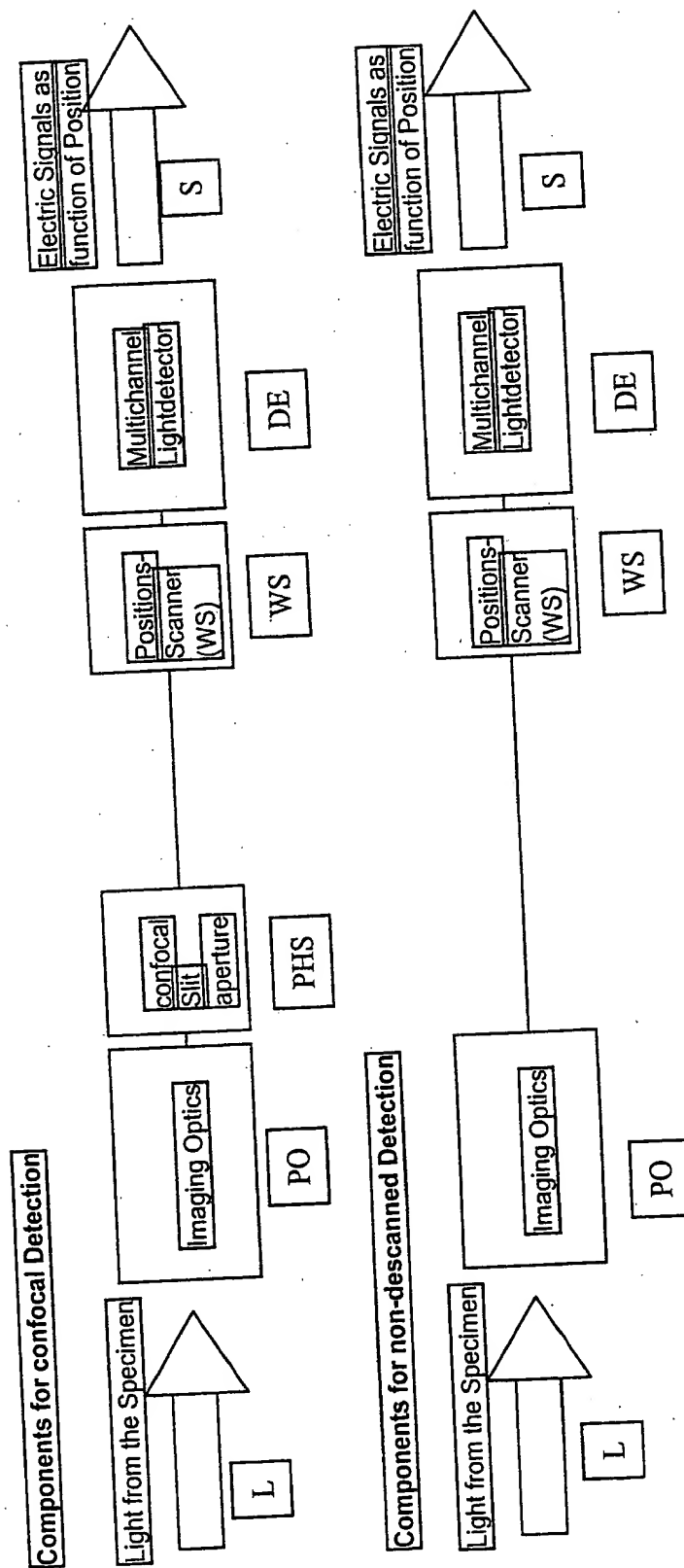
Blockschaltbild Aufbau Detektoreinheit / Optik

Figure: 5



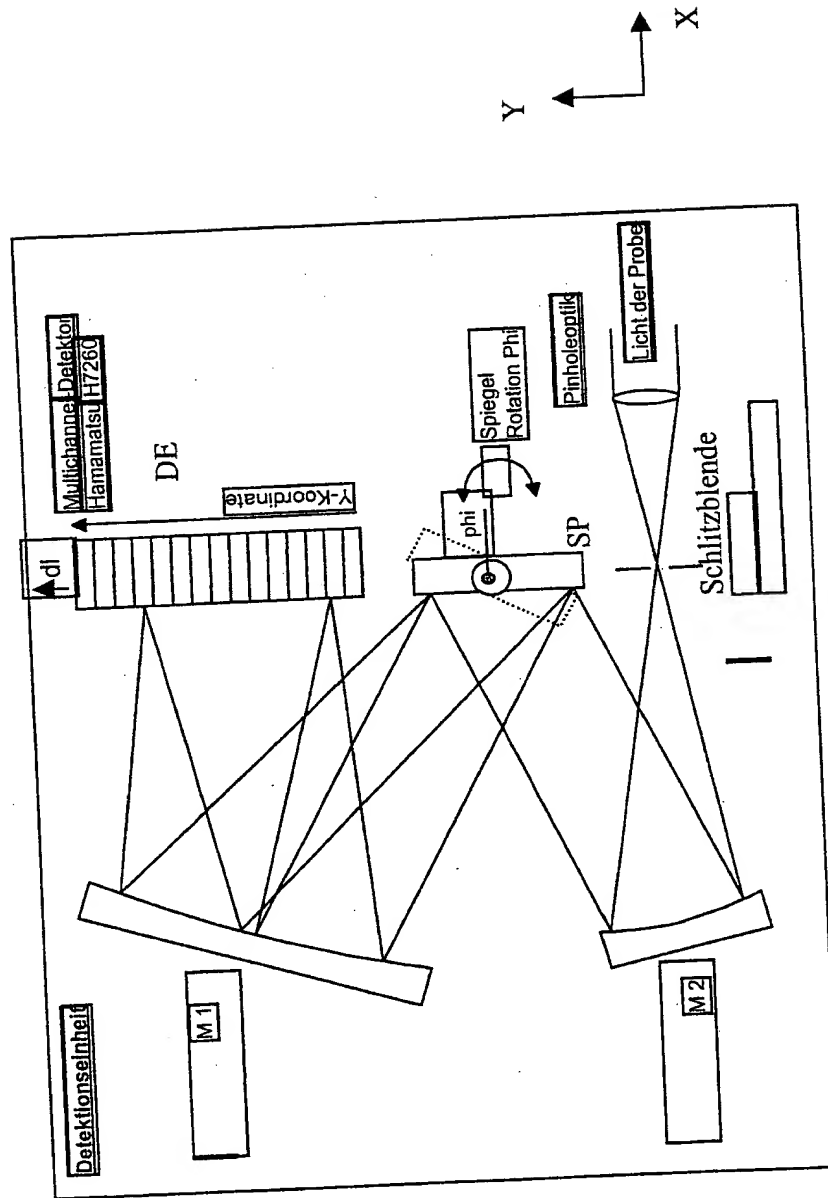
Beispiel Aufbau Detektoreinheit / Optik

Figure: 6



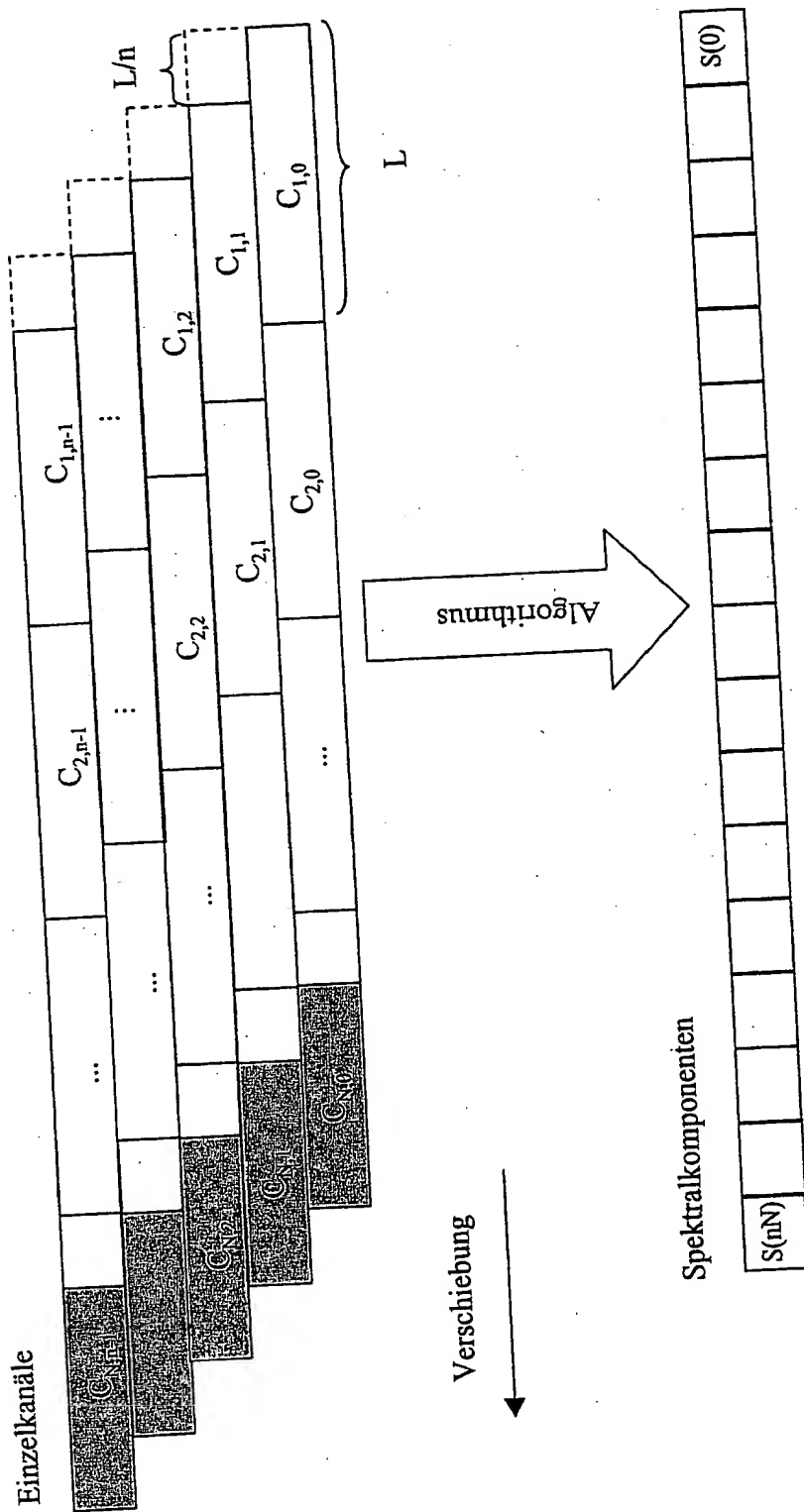
Blockschaltbild Aufbau Detektoreinheit / Optik für Linienscanner

Figure: 7



Beispiel Aufbau Detektoreinheit / Optik für Linienscanner

Figure: 8



Algorithmus Pixelshift (top) and calculated sub-pixels (bottom)

Figure: 10

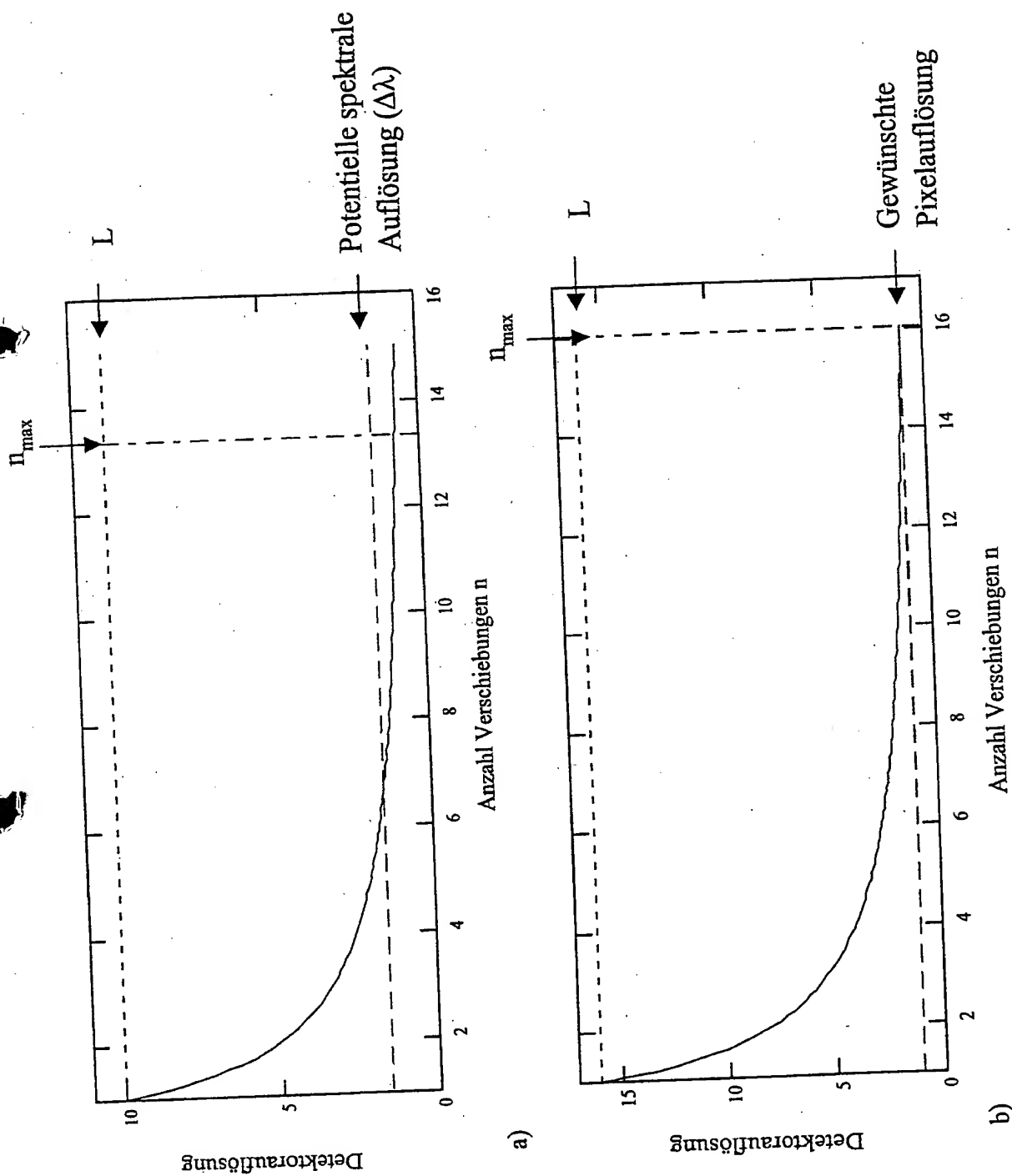
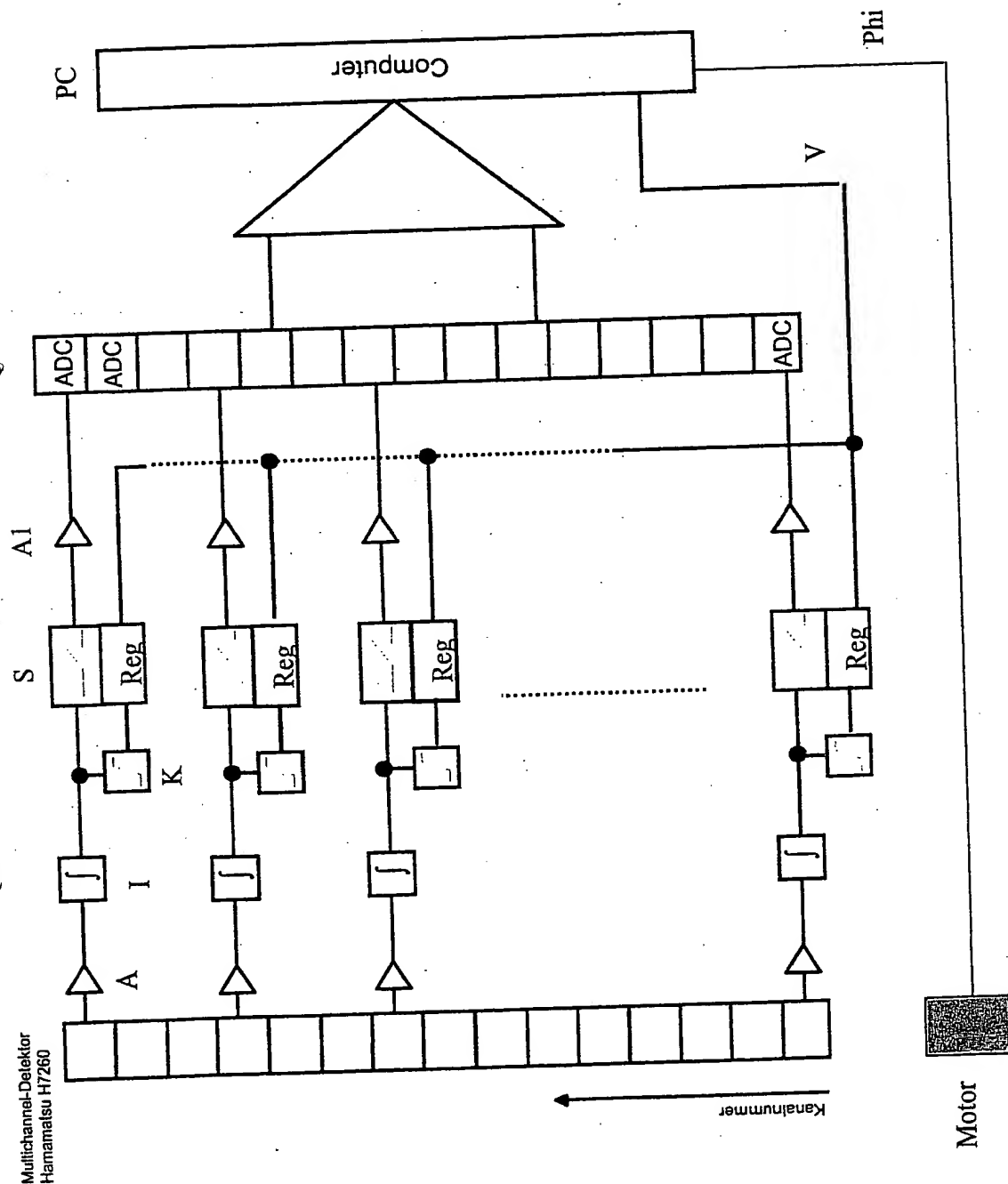


Figure: 11

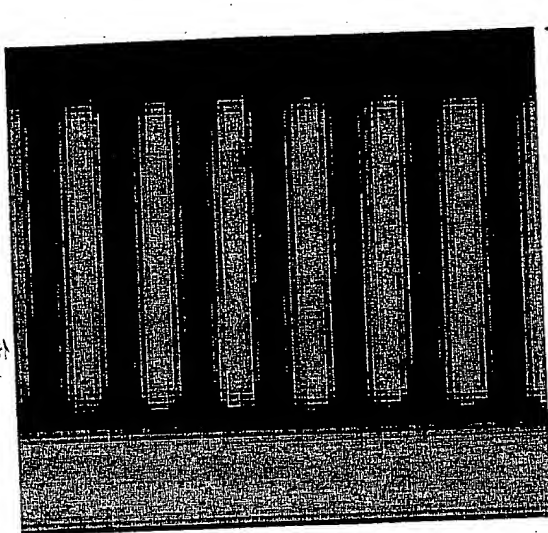




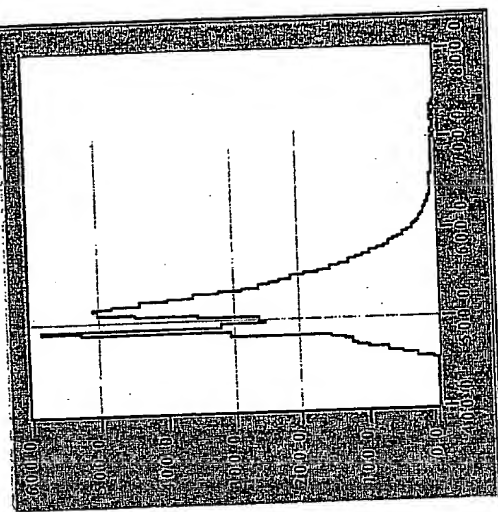
## Beispiel Aufbau der Elektronik

Figure: 12

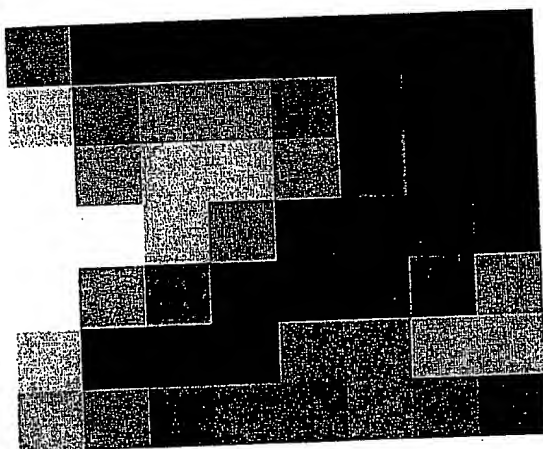
2.)



Messung Spektrometer

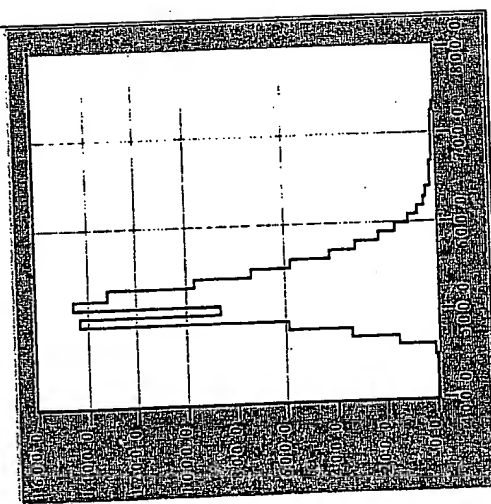


1.)



b.)

Messung Spektrometer



a.)

A.) Beispiel Spektrum, B.) Beispiel Bild

Figure: 13



Creation date: 06-24-2004  
Indexing Officer: PCHISHOLM - PATRICIA CHISHOLM  
Team: OIPEBackFileIndexing  
Dossier: 09924268

Legal Date: 04-01-2002

No.	Doccode	Number of pages
1	IDS	2
2	NPL	1
3	NPL	1
4	NPL	1
5	NPL	1
6	NPL	37
7	NPL	3
8	NPL	8

Total number of pages: 54

Remarks:

Order of re-scan issued on .....